

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Н. Кроткова

29.09.2023

Регистрационный № 091-0923

**МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ ТОКСИЧЕСКИХ
ОСЛОЖНЕНИЙ 3-4 СТЕПЕНИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОСТРОГО
ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ**

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доцент Н.Н. Климкович, д-р мед. наук, профессор С.А. Костюк, канд. биол. наук, доцент Т.В. Руденкова, А.Н. Демиденко, С.Н. Алешкевич

Минск, 2023

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложен метод оценки вероятности развития токсических осложнений 3-4 степени при лечении острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, может быть использован в комплексе медицинской профилактики развития токсических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ у детей.

Инструкция предназначена для врачей-онкологов-гематологов детских, врачей-гематологов, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам детского возраста с ОЛЛ в стационарных и (или) амбулаторных условиях, и (или) в условиях отделений дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

С91.0 Острый лимфобластный лейкоз

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ

Для получения биологического материала вакутайнер для взятия крови из вены.

Для проведения полимеразной цепной реакции с последующим определением полиморфизма генов цитохрома P450:

набор реагентов для выделения ДНК из биологического материала;

набор реагентов мастер-микс для постановки ПЦР;

праймеры;

интеркалирующий краситель для анализа кривых плавления

продуктов ПЦР высокого разрешения (high resolution melting analysis – HRM-анализ);

амплификатор;

камера для горизонтального электрофореза;

компьютеры и программное обеспечение для биоинформационного анализа.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод определения вероятности развития токсических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ у детей реализуется поэтапно. Полученные данные при проведении молекулярно-генетических исследований вносятся в таблицу, а затем суммируются значения имеющихся признаков.

I этап – выделение ДНК.

Биологическим материалом для анализа служит ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови.

Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводятся спектрофотометрические исследования с определением отношения поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$).

II этап – определение аллельных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6*.

В пробирку вносят выделенную ДНК, мастер-микс для ПЦР, полимеразу, смесь праймеров для каждого из выявленных вариантов.

Для выявления вариантов генов цитохрома P450 (*CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6*) используют следующие пары специфических олигонуклеотидных праймеров (таблица 1):

Таблица 1 – Последовательности праймеров и ферменты для рестрикции фрагментов генов *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6*

Ген	№ rs	Фермент	Последовательность праймера
<i>CYP1A1</i>	rs1048943	<i>BsrDI</i>	F-CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC
			R-TTCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC
	rs4646903	<i>MspI</i>	F-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT
			R-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT
<i>CYP2E1</i>	rs6413432	<i>DraI</i>	F-TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG
			R-GAGCTCTGATGCAAGTATCGCA
	rs3813867	<i>Pst I</i>	F-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA
			R-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG
	rs2031920	<i>RsaI</i>	F-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA
			R-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG
<i>CYP2D6</i>	rs35742686	<i>MspI</i>	F-ATGAGCTGCTAACTGAGCCC
			R-CCGAGAGCATACTCGGGAC
	rs3892097	<i>MvaI</i>	F-TGCCGCCTTCGCCAACCCT
			R-TCGCCCTGCAGAGACTCCTC
	rs1065852	<i>HphI</i>	F-GTGCTGAGAGTGTCTGCTGCC
			R-CACCCACCATCCATGTTTGC

В ходе исследований используют следующие программы амплификации (таблица 2):

Таблица 2 - Программы амплификации фрагментов генов *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6*

Ген	№ rs	Программа амплификации
<i>CYP1A1</i>	rs1048943	1 цикл: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 40 с, 64°C – 40 с, 72°C – 40с. 1 цикл: 72°C – 10 мин.
	rs4646903	1 цикл: 95°C – 5 мин; 30 циклов: 95°C – 60 с, 57°C – 60 с, 72°C – 90с. 1 цикл: 72°C – 10 мин.

<i>CYP2E1</i>	rs6413432	1 цикл: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 40 с, 60°C – 40 с, 72°C – 60с. 1 цикл: 72°C – 10 мин.
	rs3813867	1 цикл: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 30с. 1 цикл: 72°C – 10 мин.
	rs2031920	1 цикл: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 50°C – 30 с, 72°C – 30с. 1 цикл: 72°C – 10 мин.
<i>CYP2D6</i>	rs35742686	1 цикл: 95°C – 5 мин; 40 циклов: 95°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30с. 1 цикл: 72°C – 10 мин.
	rs3892097	1 цикл: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 62°C – 30 с, 72°C – 30с. 1 цикл: 72°C – 10 мин.
	rs1065852	1 цикл: 95°C – 5 мин; 35 циклов: 95°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 30с. 1 цикл: 72°C – 10 мин.

III этап – определение генотипных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6*.

Определение генотипных (установление спектров гомо – и гетерозигот) вариантов проводят с применением метода анализа кривых плавления продуктов ПЦР высокого разрешения (high resolution melting analysis – HRM-анализ).

Анализ результатов рестрикции амплифицированных фрагментов проводится в 3% агарозном геле методом электрофоретического анализа.

Генотипные варианты *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6* представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Вариант генотипа и длина продуктов рестрикции фрагментов генов *CYP1A1*, *CYP2E1*, *CYP2D6*

Ген	Фермент	Длина продукта (пар оснований)	Замена	Генотип – длина продуктов расщепления (пар оснований)
<i>CYP1A1</i>	<i>BsrDI</i>	204	A2455G	Дикий тип (AA) – 150, 54
				Гетерозигота (AG) – 204, 150, 54
				Мутантный тип (GG) – 204
	<i>MspI</i>	340	T3801C	Дикий тип (TT) – 340
				Гетерозигота (TC) – 340, 200, 140
				Мутантный тип (CC) – 200, 140
<i>CYP2E1</i>	<i>DraI</i>	995	T7632A	Дикий тип (TT) – 571, 305, 121
				Гетерозигота (TA) – 876, 571, 305, 121
				Мутантный тип (AA) – 876, 121
<i>CYP2E1</i>	<i>PstI</i>	410	G1293C	Дикий тип (GG) – 410
				Гетерозигота (GC) – 410, 290, 120
				Мутантный тип (CC) – 290, 120
	<i>RsaI</i>	410	C1053T	Дикий тип (CC) – 360, 50
				Гетерозигота (CT) – 410, 360, 50
				Мутантный тип (TT) – 410
<i>CYP2D6</i>	<i>MspI</i>	270	A2549del	Дикий тип (AA) – 188, 82
				Гетерозигота (A/del) – 188, 168, 20
				Мутантный тип (del/del) – 168, 20
	<i>MvaI</i>	309	G1846A	Дикий тип (GG) – 201, 108
				Гетерозигота (GA) – 309, 201, 108
				Мутантный тип (AA) – 309
	<i>HphI</i>	330	C100T	Дикий тип (CC) – 282, 62
				Гетерозигота (CT) – 282, 182, 100
				Мутантный тип (TT) – 182, 100

IV этап – аналитический. Принятие управленческого решения.

Полученные при проведении этапов II и III данные вносятся в

таблицу с отметкой в соответствующей колонке количества баллов при наличии признака для определения вероятности развития токсических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ у детей (таблицы 4 -6).

Таблица 4 – Индивидуальное прогнозирование вероятности развития панкреотоксических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ

Показатель	Значимость признака в баллах	Результат пациента
АА-генотип А4889G гена CYP1A1	1	
АG-генотип А4889G гена CYP1A1	0	
GG -генотип А4889G гена CYP1A1	10	
АА-генотип А2549del гена CYP2D6	1	
А/del-генотип А2549del гена CYP2D6	3	
del/del-генотип А2549del гена CYP2D6	2	
Всего		

При наличии суммарно количества баллов менее 4 формируется заключение – «низкая вероятность развития панкреотоксических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ».

При наличии суммарно количества баллов более 4 формируется заключение – «высокая вероятность развития панкреотоксических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ».

При низком риске развития панкреотоксических осложнений 3-4 степени лечение ОЛЛ осуществляется согласно клиническому протоколу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 113 от 05 декабря 2022г.

При высоком риске развития панкреотоксических осложнений 3-4 степени лечение ОЛЛ осуществляется согласно клиническому протоколу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 113 от 05 декабря 2022г., кратность лабораторного контроля (амилаза сыворотки крови, панкреатическая амилаза сыворотки крови) 1 раз в 5 дней, проведение

медицинской профилактики острого панкреатита.

Таблица 5 – Индивидуальное прогнозирование вероятности развития гипергликемии свыше 13,9 ммоль/л (3-4 степень токсичности) при лечении ОЛЛ

Показатель	Значимость признака в баллах	Результат пациента
GG-генотип G1846A гена <i>CYP2D6</i>	0	
AG- генотип G1846A гена <i>CYP2D6</i>	1	
AA- генотип G1846A гена <i>CYP2D6</i>	0	
AA-генотип A2549del гена <i>CYP2D6</i>	0	
A/del-генотип A2549del гена <i>CYP2D6</i>	1	
del/del-генотип A2549del гена <i>CYP2D6</i>	4	
CC-генотип C100T гена <i>CYP2D6</i>	0	
CT-генотип C100T гена <i>CYP2D6</i>	1	
TT-генотип C100T гена <i>CYP2D6</i>	1	
Всего		

При наличии суммарно количества баллов менее 6 формируется заключение – «низкая вероятность развития гипергликемии свыше 13,9 ммоль/л при лечении ОЛЛ».

При наличии суммарно количества баллов более 6 формируется заключение – «высокая вероятность развития гипергликемии свыше 13,9 ммоль/л при лечении ОЛЛ».

При низком риске развития гипергликемии свыше 13,9 ммоль/л (3-4 степень токсичности) лечение ОЛЛ осуществляется согласно клиническому протоколу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 113 от 05 декабря 2022г.

При высоком риске развития гипергликемии свыше 13,9 ммоль/л (3-4 степень токсичности) лечение ОЛЛ осуществляется согласно

клиническому протоколу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 113 от 05 декабря 2022г., консультация врача-эндокринолога, проведение лабораторного контроля (глюкоза сыворотки крови 1 раз в 3 дня, инсулин и индекс инсулинорезистентности НОМА- IR 1 раз в 10 дней).

Таблица 6 – Индивидуальное прогнозирование вероятности развития аллергических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ

Показатель	Значимость признака в баллах	Результат пациента
АА-генотип А4889G гена <i>CYP1A1</i>	1	
АG-генотип А4889G гена <i>CYP1A1</i>	3	
GG -генотип А4889G гена <i>CYP1A1</i>	0	
СС-генотип С1053Т гена <i>CYP2E1</i>	1	
СТ-генотип С1053Т гена <i>CYP2E1</i>	0	
ТТ-генотип С1053Т гена <i>CYP2E1</i>	5	
GG-генотип G1293C гена <i>CYP2E1</i>	1	
GC-генотип G1293C гена <i>CYP2E1</i>	2	
АА-генотип А2549del гена <i>CYP2D6</i>	1	
А/del-генотип А2549del гена <i>CYP2D6</i>	3	
del/del-генотип А2549del гена <i>CYP2D6</i>	0	
СС-генотип С100Т гена <i>CYP2D6</i>	1	
СТ-генотип С100Т гена <i>CYP2D6</i>	1	
ТТ-генотип С100Т гена <i>CYP2D6</i>	2	
Всего		

При наличии суммарно количества баллов менее 7 формируется заключение – «низкая вероятность развития аллергических осложнений 3-4 степени при лечении ОЛЛ».

При наличии суммарно количества баллов более 7 формируется заключение – «высокая вероятность развития аллергических осложнений

3-4 степени при лечении ОЛЛ».

При низком риске развития аллергических осложнений 3-4 степени лечение ОЛЛ осуществляется согласно клиническому протоколу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 113 от 05 декабря 2022г.

При высоком риске развития аллергических осложнений 3-4 степени лечение ОЛЛ осуществляется согласно клиническому протоколу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 113 от 05 декабря 2022г., консультация врача-аллерголога-иммунолога, проведение медицинской профилактики аллергического осложнения в виде введения антигистаминных лекарственных средств перед введением лекарственных препаратов аспарагиназы.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При правильном выполнении манипуляций, изложенных в настоящей инструкции, ошибки исключены.